



## بررسی اثر محافظت نوروئی ترهالوز بر سلول های عصبی

# Neuroprotective efficacy of Trehalose on neural stem cells



علوم پزشکی قزوین



منابع



اطلاعات تفصیلی



مجری و همکاران



صفحه نخست سامانه

چاپ صفحه

مجریان:

کلمات کلیدی: ترهالوز، سلولهای بنیادین عصبی



## اطلاعات کلی طرح

کد طرح	۱۴۰۰۱۷۹۷
عنوان فارسی طرح	بررسی اثر محافظت نوروئی ترهالوز بر سلول های عصبی
عنوان لاتین طرح	Neuroprotective efficacy of Trehalose on neural stem cells
کلمات کلیدی	ترهالوز، سلولهای بنیادین عصبی
نوع طرح	
نوع مطالعه	
مدت اجراء - روز	۱۴۴
ضرورت انجام تحقیق	«سلولهای بنیادی»، سلولهایی با توانایی تقسیم بالا هستند. سلولهای حاصل به انواع مختلف سلولهای دیگر تمایز می یابند و ممکن است در مسیر تمایز، مانند سلولهای عصبی، قابلیت تقسیم شدن را از دست بدهند. از سلولهای بنیادی می توان در تولید سلولها و نهایتا بافت های مختلف نیز استفاده کرد. تکنولوژی سلولهای بنیادی علاوه بر استفاده از این سلولها جهت درمان بیماری ها و ترمیم و نو سازی بافت ها، اخیرا روی تولید این سلولها نیز متمرکز شده است. ترهالوز، یک افزودنی خوراکی است که کیفیت غذاهای خشک و فراوری شده را با خوشمزه تر

نمودن آنها بهبود می‌بخشد. [۱]. آزمایش‌های اخیر نشان داده‌است که ترهالوز می‌تواند مانع از تجمع پروتئین‌هایی مانند آمیلوئید بتا (در بیماری آلزایمر)، هانتینگتین (در بیماری هانتینگتون) و پریون (در بیماری کروتزفیلد جاکوب) شود. به این ترتیب می‌توان از این قند به عنوان دارویی علیه این بیماری‌ها بهره جست. ترهالوز به عنوان یک روند محافظتی از سلول در برابر استرس متابولیت عمل می‌کند. در این بررسی نقش ترهالوز که یک ماده موثر می‌باشد، در تعداد سلول‌های عصبی مطالعه می‌شود.

هدف کلی	بررسی اثر محافظت نورونی ترهالوز بر سلول های عصبی
خلاصه روش کار	سلول‌های عصبی در فلاسک کشت داده می‌شوند. هنگامی که تراکم سلول‌های چسبیده به کف فلاسک به ۷۰ تا ۸۰ درصد رسید، سلول‌ها پس از شستشو با PBS به وسیله $0.25\%$ (Germany, Merck) Trypsin و $0.04\%$ (Germany, Merck) EDTA از کف فلاسک کنده شده و پس از سانتریفوژ در ۱۵۰۰ دور در دقیقه جمع‌آوری شده و سلول‌ها پاساژ داده می‌شوند. سلول‌های عصبی در محیط کشت تا پاساژ سوم در محیط کشت حاوی ترهالوز و بدون آن کشت داده می‌شوند. در این بررسی درصد سلول‌های زنده و مرده در پاساژ ۳ به وسیله تریپان بلو مشخص می‌گردد.

اطلاعات مجری و همکاران				
نام و نام خانوادگی	سمت در طرح	نوع همکاری	درجه تحصیلی	پست الکترونیک
ساناز جمشیدی	همکار اجرایی		Extern	sanazjamshidi.medicen.۱۳۹۳@gmail.com

اطلاعات تفصیلی	
عنوان	متن
چکیده طرح	به پیوست ذکر گردیده است
پیشینه طرح	به پیوست ذکر گردیده است
فهرست کلی فصول	به پیوست ذکر گردیده است
هدف از اجرا	بررسی اثر محافظت نورونی ترهالوز بر سلول های عصبی
فرضیات یا سوالات پژوهشی	۱- ترهالوز باعث افزایش بقای سلولی می‌شود و پس از رنگ آمیزی با تریپان بلو در صد مرگ و میر کمتری مشاهده می‌شود
چه موسساتی می‌توانند از نتایج طرح استفاده نمایند؟	موسسات درمانی
در صورت ساخت دستگاه نظر صنعت و داوران	ندارد
کلید واژه های فارسی	ترهالوز، سلول‌های عصبی

روش پژوهش و تکنیک‌های اجرایی

سلولهای عصبی در فلاسک کشت داده می شوند. هنگامی که تراکم سلول های چسبیده به کف فلاسک به ۷۰ تا ۸۰ درصد رسید، سلول ها پس از شستشو با PBS به وسیله EDTA ۰.۰۴% (Germany, Merck) و Trypsin ۰.۲۵% (Germany, Merck) به کف فلاسک کنده شده و پس از سانتریفوژ در ۱۵۰۰ دور در دقیقه جمع آوری شده و سلول ها پاساژ داده می شوند. سلولهای عصبی در محیط کشت تا پاساژ سوم در محیط کشت حاوی ترهالوز و بدون آن کشت داده می شوند. در پاساژ سوم، تعداد ۵۰۰۰ سلول به طور مساوی در هر یک از خانه‌های پلیت ۲۴ خانه ای لامل گذاری شده ریخته شد. سلولها در محیط کشت حاوی مواد زیر کشت داده می شوند: ۲% Brv (Invitrogen, Germany), ۲۰ ng/ml EGF (Sigma, Steinheim), ۲۰ ng/ml bFGF (Chemicon, Germany) و ۲۰ ng/ml bFGF (Chemicon, Germany) در این بررسی درصد سلول های زنده و مرده در پاساژ ۳ مشخص میگردد. برای انجام این بررسی یک حجم سوسپانسیون سلولی و یک حجم مساوی از رنگ تریپان بلو مخلوط و شمارش سلولی با استفاده از لام نتوبار در زیر میکروسکپ اینورت انجام می شود. در این روش رنگ به داخل سلول های مرده نفوذ می کند و به رنگ آبی در می آید و سلول های رنگ نشده معرف سلول های زنده هستند که با شمارش کل سلول ها و سلول های رنگ شده درصد سلول های زنده به دست می آید.

دلایل ضرورت و توجیه انجام کار	در طرح ذکر گردیده است
کلید واژه های فارسی بازنگری شده	ندارد
فهرست منابع و مراجع علمی داخلی	ندارد
فهرست منابع و مراجع علمی خارجی	<p>Woodbury D, Reynolds K, Black IB. Adult bone marrow stromal stem cells express ۱. germline, ectodermal, endodermal, and mesodermal genes prior to neurogenesis. J Neurosci Res ۲۰۰۲; ۶۹(۶):۹۰۸-۹۱۷. ۲. Reynolds BA, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. Science ۱۹۹۲; ۲۵۵(۵۰۵۲):۱۷۰۷-۱۷۱۰. ۳. Kohyama J, Abe H, Shimazaki T, Koizumi A, Nakashima K, Gojo S, Taga T, Okano H, Hata J, Umezawa A. Brain from bone: efficient 'meta-differentiation' of marrow stroma-derived mature osteoblasts to neurons with Noggin or a demethylating agent. Differentiation ۲۰۰۱; ۶۸(۴-۵):۲۳۵-۲۴۴. ۴. Hermann A, Gastl R, Liebau S, Popa MO, Fiedler J, Boehm BO, Maisel M, Lerche H, Schwarz J, Brenner R et al. Efficient generation of neural stem cell-like cells from adult human bone marrow stromal cells. J Cell Sci ۲۰۰۴; ۱۱۷(Pt ۱۹):۴۴۱۱-۴۴۲۲. ۵. Lu P, Blesch A, Tuszynski MH. Induction of bone marrow stromal cells to neurons: differentiation, transdifferentiation, or artifact? J Neurosci Res ۲۰۰۴; ۷۷(۲):۱۷۴-۱۹۱. ۶. Neuhuber B, Gallo G, Howard L, Kostura L, Mackay A, Fischer I. Reevaluation of in vitro differentiation protocols for bone marrow stromal cells: disruption of actin cytoskeleton induces rapid morphological changes and mimics neuronal phenotype. J Neurosci Res ۲۰۰۴; ۷۷(۲):۱۹۲-۲۰۴. ۷. Vavrek R, Pearse DD, Fouad K. Neuronal populations capable of regeneration following a combined treatment in rats with spinal cord transection. J Neurotrauma ۲۰۰۷; ۲۴(۱۰):۱۶۶۷-۱۶۷۳. ۸. Hermann A, Gastl R,</p>

Liebau S, Popa MO, Fiedler J, Boehm BO, Maisel M, Lerche H, Schwarz J, Brenner R et al. Efficient generation of neural stem cell-like cells from adult human bone marrow stromal cells. *J Cell Sci* ۲۰۰۴; ۱۱۷(Pt ۱۹):۴۴۱۱-۴۴۲۲. ۹. Kunkel-Bagden E, Dai HN, Bregman BS. Recovery of function after spinal cord hemisection in newborn and adult rats: differential effects on reflex and locomotor function. *Exp Neurol* ۱۹۹۲; ۱۱۶(۱):۴۰-۵۱. ۱۰. Fuchigami T, Kakinohana O, Hefferan MP, Lukacova N, Marsala S, Platoshyn O, Sugahara K, Yaksh TL, Marsala M. Potent suppression of stretch reflex activity after systemic or spinal delivery of tizanidine in rats with spinal ischemia-induced chronic spastic paraplegia. *Neuroscience* ۲۰۱۱; ۱۹۴:۱۶۰-۱۶۹. ۱۱. Tanaka, M. et al. Trehalose alleviates polyglutamine-mediated pathology in a mouse model of Huntington disease. *Nature Medicine*, published online, doi:۱۰.۱۰۳۸/nm۹۸۵,۲۰۰۴ ۱۲. Higashiyama, T. Novel functions and applications of trehalose. *Pure Appl. Chem.* ۷۴(۷):۱۲۶۳-۱۲۶۹. ۲۰۰۲

خلاصه نتیجه اجرای طرح	
سابقه علمی طرح و پژوهش‌های انجام شده با ذکر مأخذ به ویژه در ایران	
خلاصه طرح طبق اهداف پیش بینی شده	
WhatRequirementsAreMet	
ملاحظات گروه	
ملاحظات ناظر	
HomeAddress	
WorkPlace	
بررسی Viability سلول ها و شمارش سلولی با روش ANOVA و Tukey post hoc و به وسیله نرم افزار SPSS version ۱۳ انجام میگیرد. سطح معنی داری $P < 0.05$ در نظر گرفته می شود.	جامعه مورد مطالعه و روش نمونه گیری
<p>«سلولهای بنیادی»، سلولهایی با توانایی تقسیم بالا هستند. سلولهای حاصل به انواع مختلف سلولهای دیگر تمایز می‌یابند و ممکن است در مسیر تمایز، مانند سلولهای عصبی، قابلیت تقسیم شدن را از دست بدهند. از سلولهای بنیادی می‌توان در تولید سلولها و نهایتاً بافت‌های مختلف نیز استفاده کرد. امروزه استفاده از این سلولها جهت ترمیم بافت‌های آسیب‌دیده در حال گسترش است. سلولهای بنیادی را بر اساس میزان توانایی آنها در تولید بافت‌های مختلف، به «تمام توان»، «پر توان»، «چند توان» و «تک توان» تقسیم می‌کنند. تکنولوژی سلولهای بنیادی علاوه بر استفاده از این سلولها جهت درمان بیماری‌ها و ترمیم و نو سازی بافت‌ها، اخیراً روی تولید این سلولها نیز متمرکز شده است. نوبل پزشکی سال ۲۰۱۲ به خاطر کشف روشی برای بازسازی سلولهای بنیادی از سلولهای تمایز یافته، مشترکاً به دکتر جان بی. گوردون (John B. Gurdon) و شینیا یاماناکا (Shinya Yamanaka) اعطا شد. منابع اصلی سلولهای بنیادی شامل: مغز استخوان، بند ناف، پالپ دندان، بعضی بافت‌های چربی و جفت و سیستم عصبی</p>	

می‌باشد. سلولهای بنیادی عصبی: سلولهای بنیادین عصبی در درمان بیماریهای سیستم عصبی کاربرد گستردهای دارند. امروزه در مطالعات سیستم عصبی نشان داده شده که تمامی انواع سلولهای سیستم عصبی یک منشا مشترک دارند. تعداد و الگوهای رشد و نمو آنها در گونه‌های مختلف با هم تفاوت دارد. به نظر می‌رسد این سلولها جمعیت‌های سلول بنیادی مختلفی را ارائه می‌دهند و تنها یک مدل سلول بنیادی نیستند که در چند مکان توزیع شده باشند. نمو نرمال مغز تنها به تکثیر و تمایز این سلولهای بنیادی جنینی بستگی دارد. اطلاعات کمی در رابطه با سلولهای بنیادی انسانی وجود دارد. در چند آزمایش نیز سلولهای بنیادی سیستم عصبی مرکزی انسانی به داخل مغز موش‌ها تزریق شدند، که سبب تمایز آنها به سلولهای شبه-نورون و گلیا شد (۱). در ۱۹۹۲ در یک مطالعه، محیط کشت بدون-سرمی شامل EGF و FGF۲ برای رشد سلولهای بنیادی CNS جنینی انسان، ابداع شد (۲). هرچند بیشتر سلولها زنده نمی‌ماندند، هر از چندگاهی، یک تک سلول بنیادی CNS بقاء یافته، تقسیم شده و نهایتاً پس از یک تا دوهفته در محیط کشت، نوروسفر تشکیل می‌دادند. نوروسفرها را می‌شد تقسیم کرد و از نو کشت داد. سلولها به تکثیر ادامه داده و نوروسفرهای جدید می‌ساختند که به این ترتیب، یک سیستم *in vitro* ایجاد شد، (مانند سیستمی که برای نوروسفرهای CNS موش ساخته شده بود) که سلولها تا ۲ سال در آن قابلیت بقاء داشتند. وابسته به شرایط کشت، سلولها در نوروسفرها می‌توانند در حالت تمایز نیافته تقسیم شوند (در حضور میتوز) یا تفکیک شده و تمایز یافته (پس از حذف میتوز) و اضافه کردن فاکتورهای رشد خاص به محیط کشت) باقی بمانند. سلولهای تمایز یافته اکثراً از آستروسیتها ۷۵٪، نورونها ۱۳٪، و اولیگودندروسیت‌های نادر ۱۰۲٪ تشکیل شده‌اند. در مطالعه ای BMSCs به نوروسفر تبدیل گردید و به وسیله *Noggin* تعداد نوروسفرها افزایش یافت [۳]. سایرین از محیط P۴-۸F برای تولید نوروسفر از BMSCs استفاده کردند [۴-۷]. محیط P۴-۸F حاوی Selenous acid, EGF, insulin, hydrocortisone, phosphoethanolamine, cholera toxin, bovine serum albumin, amino acids, vitamins و *bovine pituitary extract* می‌باشد. در این تحقیق از B۲۷ استفاده گردید که حاوی *antioxidants* و هورمون‌ها می‌باشد، همچنین از bFGF و EGF استفاده گردید، در حالی که سایر ترکیبات در این حد غنی از ویتامین‌ها، هورمون‌ها و آنتی اکسیدان‌ها نمی‌باشند. از نظر ساختاری B۲۷ غنی تر از N۲ و محیط Neurobasal است که دیگران استفاده کرده اند [۸-۱۰]. تولید NSCs از نوروسفر مشتق از ESCs برای اولین بار توسط Reynolds و Weiss شرح داده شد. ترهالوز (که میکوز هم نامیده شده) کربوهیدرات ساده‌ای است که از اتصال دو گلوکز با پیوند ساده‌ای ایجاد شده‌است. این قند به اندازه ۴۵٪ ساکاروز شیرینی دارد و از قندهای غیر احیا کننده‌است. به همین دلیل اثرات مضر که سایر قندها (مانند گلاسیکشن) بر روی پروتئین‌ها دارند، را ندارد [۱۱]. ترهالوز، یک افزودنی خوراکی است که کیفیت غذاهای خشک و فراوری شده را با خوشمزه‌تر نمودن آنها بهبود می‌بخشد [۱۲]. ترهالوز در بعضی قارچ‌ها وجود دارد. هیدرولیز آن، تولید دو مولکول گلوکز می‌کند [۱۲]. آزمایشهای اخیر نشان داده‌است که ترهالوز می‌تواند مانع از تجمع پروتئینهایی مانند آمیلوئید بتا (در بیماری آلزایمر)، هانتینگتین (در بیماری هانتینگتون) و پریون (در بیماری کروتزفیلد جاکوب) شود. به این ترتیب می‌توان از این قند به عنوان دارویی علیه این بیماری‌ها بهره جست [۱۱]. ترهالوز و سوکروز از جمله قندهایی هستند که توانایی عبور از غشاء سلولی را ندارند. وجود این قندها در رقیق‌کننده سبب ایجاد محیط هیپرتونیک شده که در پی آن، یاخته آب خود را از دست داده و چروکیدگی در آن ایجاد می‌شود [۱۱]. سلولهای استرومایی مغز استخوان در طی تشکیل و ایجاد انواع سلولهای دیگر سیستم عصبی در طی زمان و روند کشت سلولی دچار استرس‌های فراوانی می‌شوند. در طی زمان ترهالوز به عنوان یک روند محافظتی از سلول در برابر استرس متابولیت عمل می‌کند. در این بررسی نقش ترهالوز که یک ماده موثر می‌باشد، در تعداد سلولهای عصبی مطالعه می‌شود. به همین منظور تعیین میزان بقای سلولهای بنیادین عصبی به وسیله تریپان بلو قبل و بعد از استفاده از ترهالوز ارزیابی می‌گردد.



- Woodbury D, Reynolds K, Black IB. Adult bone marrow stromal stem cells express germline, .1  
ectodermal, endodermal, and mesodermal genes prior to neurogenesis. J Neurosci Res 2002; 69(6):908-  
.917
- Reynolds BA, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult .2  
mammalian central nervous system. Science 1992; 255(5052):1707-1710
- Kohyama J, Abe H, Shimazaki T, Koizumi A, Nakashima K, Gojo S, Taga T, Okano H, Hata J, Umezawa .3  
A. Brain from bone: efficient "meta-differentiation" of marrow stroma-derived mature osteoblasts to neurons  
.with Noggin or a demethylating agent. Differentiation 2001; 68(4-5):235-244
- Hermann A, Gastl R, Liebau S, Popa MO, Fiedler J, Boehm BO, Maisel M, Lerche H, Schwarz J, .4  
Brenner R et al. Efficient generation of neural stem cell-like cells from adult human bone marrow stromal  
.cells. J Cell Sci 2004; 117(Pt 19):4411-4422
- Lu P, Blesch A, Tuszynski MH. Induction of bone marrow stromal cells to neurons: differentiation, .5  
.transdifferentiation, or artifact? J Neurosci Res 2004; 77(2):174-191
- Neuhuber B, Gallo G, Howard L, Kostura L, Mackay A, Fischer I. Reevaluation of in vitro differentiation .6  
protocols for bone marrow stromal cells: disruption of actin cytoskeleton induces rapid morphological  
.changes and mimics neuronal phenotype. J Neurosci Res 2004; 77(2):192-204
- Vavrek R, Pearse DD, Fouad K. Neuronal populations capable of regeneration following a combined .7  
.treatment in rats with spinal cord transection. J Neurotrauma 2007; 24(10):1667-1673
- Hermann A, Gastl R, Liebau S, Popa MO, Fiedler J, Boehm BO, Maisel M, Lerche H, Schwarz J, .8  
Brenner R et al. Efficient generation of neural stem cell-like cells from adult human bone marrow stromal  
.cells. J Cell Sci 2004; 117(Pt 19):4411-4422
- Kunkel-Bagden E, Dai HN, Bregman BS. Recovery of function after spinal cord hemisection in newborn .9  
.and adult rats: differential effects on reflex and locomotor function. Exp Neurol 1992; 116(1):40-51
- Fuchigami T, Kakinohana O, Hefferan MP, Lukacova N, Marsala S, Platoshyn O, Sugahara K, Yaksh TL, .10  
Marsala M. Potent suppression of stretch reflex activity after systemic or spinal delivery of tizanidine in rats  
.with spinal ischemia-induced chronic spastic paraplegia. Neuroscience 2011; 194:160-169

Tanaka, M. et al. Trehalose alleviates polyglutamine-mediated pathology in a mouse model of .11  
Huntington disease. Nature Medicine, published online, doi:10.1038/nm.2511

Higashiyama, T. Novel functions and applications of trehalose. Pure Appl. Chem .12  
2008

---